Rev.Acad.Canar.Cienc., IX (Núms. 2,3 y 4), 173-189 (1997)

RADICALES LIBRES:
UNA REVISIÓN DE SU PAPEL EN LA BIOLOGÍA DE LA CÉLULA.

Paula Lecuona y José Regidor

Departamento de Morfología. Centro de Ciencias de la Salud. Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. Apartado Postal. 550. 35080 Las Palmas de Gran Canaria

1.- Radicales libres

1.1.- Radicales libres del oxígeno: conceptos básicos, formación y tipos

En la actualidad se acepta que, en las etapas primigenias de la evolución del planeta Tierra, las primeras moléculas biógenas surgieron en una atmósfera químicamente reductora, compuesta por hidrógeno, amoniaco, metano y vapor de agua, en condiciones de elevadas temperaturas y altos niveles de irradiación (ausencia de capa de ozono). Seguramente fueron aminoácidos y otras moléculas hidrocarbonadas las primeras en formarse, para hacerlo posteriormente, moléculas bioquímicas más complejas. La formación de comunidades bioquímicas autótrofas constituyeron, probablemente, las primeras etapas celulares.

ABREVIATURAS

CAT = Catalasa	$NO^{\bullet}$ = Óxido nítrico	$RO^{\bullet}$ = Radical alcoxi
e = Electrón	O_2^{-} = Radical superóxido	$ROO^{\bullet}$ = Radical peróxido
GP = Glutatión peroxidasa	$^{1}O_2$ = Oxigeno singlete	$ROOH$ = hidroperóxidos lipídicos
GSH = Glutatión reducido	$OH^{\bullet}$ = Radical hidroxil	ROH = Alcoholes lipidicos
$GSSG$ = Glutatión oxidado	$ONOO^{-}$ = Anión peroxinitrito	SOD = Superóxido dismutasa
H_2O_2 = Peróxido de hidrógeno	$ONOOH$ = Nitrosilo	

En este medio ambiente, los organismos anaerobios autótrofos fueron los únicos representantes hasta la aparición de las algas verde-azuladas capaces de aprovechar uno de los substratos más abundantes en el planeta: el agua, para obtener hidrógeno empleando la prácticamente inagotable energía solar, (fotolisis del agua), lo que permitió la liberación de un subproducto de la reacción, el O_2, a la biosfera. La aparición de O_2 libre cambió la estructura química de muchos compuestos de carbono, hidrógeno y nitrógeno, dando lugar a las formas CO_2, N_2 y H_2O, que provocaban la ruptura de las biomoléculas de la materia viva.

Paradójicamente, a partir de ese momento, la selección natural favoreció a los organismos que usaban mecanismos fotosintéticos, con el consiguiente aumento de la densidad de O_2 en la atmósfera. Por tanto, la supervivencia de los organismos anaerobios mayoritarios, dependía de la adquisición de mecanismos de defensa frente al O_2[(1)].

En condiciones fisiológicas, los organismos aerobios consumen casi un 98% del O_2 a través de la cadena respiratoria mitocondrial. Durante este proceso no se produce la liberación de intermediarios parcialmente reducidos del O_2, pero la pequeña fracción restante (1-2%) del O_2 no consumido es reducida, dando lugar a los radicales libres que son tóxicos para las células. Por ello, los organismos aerobios han desarrollado unas potentes defensas antioxidantes, que minimizan la toxicidad potencial de los radicales[(2)].

Un radical libre es un átomo o molécula con un electrón (e^-) desapareado en su orbital más externo. Según esta definición, un "birradical" es una especie que contiene dos e^- desapareados en el orbital más externo, y éste es el caso de la molécula de O_2. Así mismo, un radical ión es un radical libre con carga eléctrica, positiva o negativa[(1,3)].

Por su propia naturaleza, los radicales libres son responsables del inicio de reacciones en cadena de difícil control. De forma general, podemos considerar los siguientes tipos de reacciones [(1)]:

1.- Reacción de iniciación: tiene lugar la formación del radical libre. Este puede realizarse por varias vías[(4)]:

a) División homolítica de un enlace covalente de una molécula, reteniendo cada fragmento, uno de los e^- apareados:

$$X:Y \longrightarrow X^{\bullet} + Y^{\bullet}$$

reacción que no se da normalmente en los sistemas biológicos, ya que requiere gran cantidad de energía que suele proceder de elevadas temperaturas, luz ultravioleta o radiación ionizante.

b) Fisión heterolítica, en la que los e^- del enlace covalente son retenidos por uno sólo de los fragmentos, dando lugar a radicales iones:

$$X:Y \longrightarrow X:^{-} + Y^{+}$$

c) Transferencia de e^- singlete a una molécula normal:

$$A + e^- \longrightarrow A^{-\bullet}$$

Éste es el proceso de formación de radicales libres más común en los sistemas biológicos.

2.- Reacción de propagación: son las reacciones implicadas en la transferencia de e^-.

3.- Reacción de terminación: comprende las reacciones en las que se produce la eliminación del radical.

Una vez formado el radical, el número y complejidad de posibles reacciones aumenta. El e^- desapareado del orbital más externo le confiere a los radicales libres, una reactividad química inusual y unas características físicas especiales, presentando una gran variabilidad según la molécula. La reactividad de un radical libre va a depender de la constante de velocidad de una reacción y la concentración de la(s) sustancia(s) reaccionante(s):

$$\text{Reactividad} = [A] \times K_{A-R}$$

donde [A] es la concentración de la sustancia reaccionante, y K_{A-R} representa la constante de velocidad de la reacción. No se puede hacer gran cosa para cambiar la constante, pero podemos variar la concentración de A, mediante substratos alternativos, lo que constituye la base teórica del funcionamiento de los "secuestradores" selectivos de los radicales libres[1].

Ya se comentó anteriormente, que el oxígeno molecular, en estado natural, es un birradical con dos e^- desapareados con spins paralelos. Esta disposición previene la adición directa de un par de e^-, necesitando una inversión del spin antes de formarse el enlace. El proceso de inversión del spin es relativamente lento, lo que convierte a la molécula de O_2 en un oxidante relativamente débil. Debido a esto, predomina una reducción univalente del spin, que constituye la ruta divalente o de reducción de dos e^- [3, 5].

La ruta univalente en la que se produce la completa reducción del O_2, da lugar a la formación de una serie de radicales que dependen del grado de reducción del O_2:

$$O_2 \longrightarrow O_2^- \xrightarrow{e^- + 2H^+} H_2O_2 \xrightarrow{e^- + 2H^+} OH^\bullet + H_2O \xrightarrow{e^- + 2H^+} H_2O$$

De esta ruta se obtienen:

- el radical superóxido (O_2^-), por reducción de un e^-.

- el peróxido de hidrógeno (H_2O_2), por reducción de dos e^-.

- el radical hidroxil ($OH^\bullet$) por reducción de tres e^-.

1.1.1.- Radical superóxido (O_2^-):

Es el primer intermediario que se produce en la ruta univalente del O_2. Es muy importante, más que por su reactividad en sí, porque da lugar a otra serie de radicales y especies reactivas del O_2, que son más tóxicas que éste [1, 3, 6].

En medio acuoso, puede actuar como base formando el radical hidroperoxil ($HO_2^•$), por protonación:

$$O_2^- + H^+ \longrightarrow HO_2^•$$

En medio acuoso, actúa como agente oxidante, y es fácilmente reducido a H_2O_2, dando lugar a la reacción más importante de este radical, que es su dismutación. En medio ácido esta reacción se realiza espontáneamente, mientras que a pH neutro o básico, la dismutación es catalizada por la enzima superóxido dismutasa (SOD), a una velocidad mucho más alta:

$$O_2^- + O_2^- + 2H^+ \longrightarrow H_2O_2 + O_2$$

Puede interaccionar con el H_2O_2 generando otro tipo de especie reactiva del O_2, que es el oxígeno singlete, importante también ya que es citotóxica, aunque no es un radical propiamente dicho.

Además, el radical superóxido, puede oxidar moléculas como el ácido ascórbico y la adrenalina, y aunque normalmente no interacciona con lípidos, puede reaccionar con hidroperóxidos lipídicos, dando lugar a radicales alcoxi ($RO^•$).

1.1.2.- Peróxido de hidrógeno (H_2O_2):

El H_2O_2 no es propiamente dicho un radical, pero se considera especie reactiva del O_2. Es un producto secundario en la ruta univalente del O_2.

La principal fuente de formación de H_2O_2 es la generada por la dismutación del radical superóxido, catalizada por la superóxido dismutasa.

Puede formarse también a través de la reducción divalente del O_2, llevada a cabo por un grupo de enzimas, entre las que se encuentran implicadas ciertas oxidasas flavínicas como la urato-oxidasa, D-aminoácido-oxidasa y glicolato-oxidasa, localizadas en los peroxisomas y glioxisomas.

Aunque en sí misma no es una especie suficientemente reactiva como para oxidar muchas moléculas orgánicas (sólo cuando este radical se encuentra en elevadas concentraciones), biológicamente es importante, ya que puede generar el radical hidroxil ($OH^•$), que sí es altamente reactivo.

Tiene la característica de difundir fácilmente a través de las membranas biológicas, debido a su estado no ionizado y a su débil carga eléctrica que le confieren características hidrofóbicas [1, 3, 6].

Es también el substrato de la enzima catalasa, presente en los peroxisomas, y de la mieloperoxidasa generando productos oxidativos como hipoclorito, y posiblemente, oxígeno singlete. Estas especies están asociadas con la liberación de mieloperoxidasa de las células inflamatorias, que actúan como defensa importante contra las infecciones bacterianas, pero pueden dañar, a su vez, a las células y componentes del espacio extracelular [1].

1.1.3.- Oxígeno singlete ($^1O_2$):

Como ya se ha indicado, no se trata de un radical libre, aunque sí una especie reactiva del O_2. Aunque no es un subproducto de la ruta univalente del O_2, se comentará brevemente, ya que puede ser el resultado de varias reacciones en las que intervienen otros radicales, y puede producir también cierto daño celular.

Puede formarse después de la generación del O_2^- y del H_2O_2, por interacción de ambos radicales, y también puede ser generado como resultado de la peroxidación lipídica.

Es capaz de iniciar la peroxidación lipídica de los ácidos grasos insaturados[7], que se hallan principalmente en las membranas, lo que puede ocasionar graves alteraciones.

1.1.4.- Radical hidroxil ($OH^•$):

Es considerado como el oxidante más potente de los sistemas biológicos. Tiene una vida media muy corta, y una enorme capacidad para reaccionar con gran variedad de moléculas.

Principalmente, se produce a partir de la descomposición del H_2O_2, mediante la denominada reacción de Fenton, en la que también participan iones de hierro, y posteriormente, por la reacción de Haber-Weiss, en la que interacciona el O_2^- con el H_2O_2. Estas reacciones características forman parte de una serie de reacciones, en las que participan radicales libres y especies reactivas de oxígeno, y el hierro como metal de transición:

$$Fe^{2+} + H_2O_2 \longrightarrow Fe^{3+} + OH^• + OH^- \qquad (1)$$

$$OH^• + H_2O_2 \longrightarrow H_2O + O_2^- + H^+ \qquad (2)$$

$$O_2^- + H_2O_2 \longrightarrow O_2 + H_2O + OH^• \qquad (3)$$

$$Fe^{2+} + OH^• \longrightarrow Fe^{3+} + OH^- \qquad (4)$$

La reacción (3), que es la denominada de Haber-Weiss, se consideró como generadora de radical hidroxil, según la propuesta de Beauchamp y Fridovich, aunque se ha demostrado que se produce de forma muy lenta[1]. Sin embargo, Khan y Kasha (1994)[8] demostraron que no es el radical hidroxil, sino el oxígeno singlete la especie reactiva formada en la reacción de Haber-Weiss.

El radical $OH^\bullet$ se forma, también, por interacción del O_2^- y H_2O_2 con otros metales quelados (Me), como el cobre (Cu), siguiendo reacciones de tipo Fenton, cuyo esquema es el siguiente[1,3]:

$$Me^{n+} quelado + O_2^- \longrightarrow Me^{(n-1)+} quelado + O_2$$

$$Me^{(n-1)+} quelado + H_2O_2 \longrightarrow Me^{n+} quelado + OH^\bullet + OH^-$$

1.1.5.- Óxido nítrico ($NO^\bullet$):

El $NO^\bullet$ es un radical débil sintetizado por una gran variedad de tipos celulares, habiéndose detectado tanto en animales vertebrados como invertebrados.[9,10]

El $NO^\bullet$ es un intermediario en la síntesis de nitrato (NO_3^-) y nitrito (NO_2^-). En las células se sintetiza a partir de L-arginina interviniendo la enzima sintasa del óxido nítrico (NOS).

$$L-ARGININA + O_2 \xrightarrow{NOS} L-CITRULINA + NO^\bullet$$

De la NOS se conocen tres isoformas principales: la NOS-I muy abundante en células musculares estriadas y en algunas neuronas; la NOS-II, presente en macrófagos y hepatocitos y la NOS-III, principalmente en el endotelio vascular. NOS-I y NOS-III, son enzimas constitutivas calcio-dependientes, mientras que la NOS-II es inducible[11].

El $NO^\bullet$ es un radical libre en forma gaseosa e hidrofóbico, lo que le confiere una elevada capacidad de difusión en los sistemas biológicos. Actúa rápidamente con especies que contengan e^- desapareados, principalmente con oxígeno molecular (O_2), anión superóxido (O_2^-) y metales de transición. En este sentido es importante resaltar la acción del $NO^\bullet$ sobre las hemo-proteínas, especialmente sobre la guanilato-ciclasa soluble dando lugar a GMP cíclico.

Con el O_2 reacciona en fase gaseosa y solución acuosa formando dióxido de nitrógeno (NO_2), que es muy reactivo y, por hidrólisis de compuestos intermedios del tipo N_2O_3 y N_2O_4, da lugar a NO_2^- y NO_3^-, siguiendo dos posibles rutas alternativas[9,12,13]:

$$2NO^\bullet + O_2 \longrightarrow 2NO_2$$

$$2NO_2 \longleftrightarrow N_2O_4$$

$$N_2O_4 + 2OH^- \longrightarrow NO_2^- + NO_3^- + H_2O$$

$$NO_2 + NO^\bullet \longrightarrow N_2O_3$$

$$N_2O_3 + 2OH^- \longrightarrow 2NO_2^- + H_2O$$

Éstos van a actuar sobre tioles y aminas celulares, y aunque podría representar una importante citotoxicidad, al ser una reacción de segundo orden, no constituyen un grave peligro potencial para la célula.

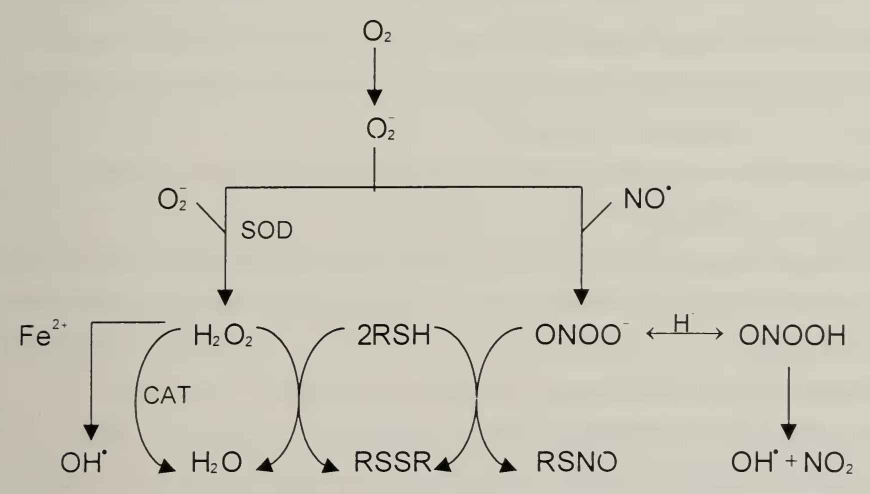
Sin embargo, el $NO^\bullet$ puede reaccionar también con el O_2^- formando el anión peroxinitrito ($ONOO^-$), es una especie inestable de vida media muy corta (<1sg), que al ser protonado se

descompone rápidamente, dando lugar al radical nitrosilo (ONOOH), que es más estable, pero que por escisión homolítica se descompone en $OH^{\bullet}$ y NO_2[2], siendo ésta la fuente más importante de $OH^{\bullet}$ en la célula

$$O_2^{-} + NO^{\bullet} \longrightarrow ONOO^{-} \xleftrightarrow{H^{+}} ONOOH \longrightarrow OH^{\bullet} + NO_2$$

El anión $ONOO^-$ *in vivo* junto con glutatión reducido (GSH) y CO_2 provoca la oxidación del GSH y la formación de un compuesto nitrosoperoxicarbonado ($ONO_2CO_2^-$) que es un potente nitrificador[9]. El anión $ONOO^-$ puede interactuar con tioles (RSH) dando lugar a nitrosotioles (RSNO) implicados en procesos de nitración, al descomponerse en $NO^{\bullet}$ y radicales tioles ($RS^{\bullet}$). Por otro lado, se ha sugerido el posible papel de los nitrosoles proteicos como reservorio de $NO^{\bullet}$ [13].

Este $ONOO^-$ puede actuar sobre grupos sulfidrilos proteicos o no. A su vez, induce la peroxidación lipídica y oxidación de la desoxirribosa mediante una descomposición catalizada por proteínas a $OH^{\bullet}$ y NO_2. Provoca también la nitración de residuos tirosina y de compuestos fenólicos por heterolisis catalizada por metales a ión nitroso (NO_2^-) [2, 13].



El $NO^{\bullet}$, en condiciones fisiológicas puede unirse al Fe de las hemoproteínas, así como a centros Fe-S de otras proteínas, modulando su activación y controlando la liberación de Fe. Sin embargo, en condiciones patológicas con superproducción del $NO^{\bullet}$, la cual va asociada a menudo a un incremento del radical O_2^-, altera la acividad enzimática y el metabolismo del hierro, provocando la pérdida de Fe intracelular que puede conducir a una mayor citotoxicidad, al producirse otros radicales de O_2 altamente reactivos mediante la reacción de Fenton[13,14].

1.2.- Mecanismo de acción de los radicales libres

Ya en 1954. Gerschmann y cols.. a raíz de los estudios realizados sobre el daño inducido por oxígeno. propusieron la denominada "Teoría del radical libre". hoy ampliamente aceptada. aunque aún persisten muchos aspectos no bien conocidos.

Se ha propuesto que bajo condiciones de O_2 ambiental. existe un balance biológico entre la producción normal de radicales de O_2. y la capacidad de defensa antioxidante celular. En este sentido. la producción de elevadas concentraciones de radicales o el fallo de los sistemas de defensa se puede romper ese equilibrio natural[(15)].

La producción de radicales libres se realiza en los sistemas biológicos. principalmente a través de reacciones de transferencia de e^-. como las producidas en las cadenas de citocromos de mitocondrias y de retículo endoplasmático[(3.4)].

Otra vía es mediante las oxidasas flavínicas. presentes en elevadas concentraciones principalmente en los peroxisomas. Por otra parte. la xantina oxidasa es una fuente importante de producción de O_2^- al reducir el citocromo c. Por su amplia localización celular se ha sugerido que esta enzima podría jugar un papel importante en el metabolismo celular[(3)]. Otro grupo de oxidasas. no tan importantes pero que también se hallan implicadas. son la aldehído oxidasa. dihidro-orótico deshidrogenasa. flavín deshidrogenasa y peroxidasa[(1)].

Los radicales libres son también producidos por la autooxidación de ciertos compuestos. como catecolaminas. flavinas y ferredoxinas[(1.4)].

Se ha demostrado también que, la actividad fagocítica producida como defensa contra patógenos. es un proceso de generación de radicales libres[(16)]. donde se presenta una elevada actividad oxidasa asociada a las membranas de células fagocíticas[(3)]. principalmente NADPH oxidasa. que reducen el O_2 a O_2^- [(1)] y la sintasa inducible del óxido nítrico[(9.11)].

Todos estos radicales libres producidos durante el metabolismo normal de la célula y. que bajo ciertas condiciones pueden resultar en exceso. atacan a las principales biomoléculas. y como hemos comentado anteriormente. alteran la estructura celular.

Sobre las proteínas producen la oxidación de los aminoácidos. que conduce a cambios importantes en la macroestructura de las proteínas. dando lugar a cambios físicos que pueden clasificarse en tres tipos: 1) fragmentación. debido a la degradación de componentes del espacio extracelular. 2) agregación. que parece estar constituida por entrecruzamientos de proteínas nativas. más que por una unión no específica de fragmentos proteicos. y 3) susceptibilidad a la degradación proteolítica. que aumenta al producirse una alteración en la conformación proteica[(1.3)]. Además. los radicales libres pueden oxidar los grupos sulfidrilos (-SH). presentes en muchas enzimas. causando

la inactivación de éstas, y provocan una inhibición de la síntesis proteica, impidiendo la incorporación de los aminoácidos en las cadenas polipeptídicas ribosomales[15].

Las membranas de células de mamíferos contienen gran cantidad de ácidos grasos poliinsaturados, que pueden constituir un blanco de ataque de muchos radicales libres. El ataque de éstos provoca una serie de reacciones en cadena, conocida como peroxidación lipídica. Puede facilitarse por la presencia de metales redox activos, como el Fe o Cu. Es un proceso de gran importancia ya que puede provocar la fragmentación de ciertos compuestos, alterar la integración celular, y además, puede extenderse y liberar productos de peroxidación al espacio extracelular, alterando la permeabilidad vascular y de las membranas celulares[1,3].

Aunque no ha sido objeto de grandes estudios, se ha demostrado que los radicales libres pueden actuar oxidando la glucosa y otros monosacáridos relacionados, los cuales a su vez, pueden interactuar con otras moléculas formando, por lo tanto, nuevas estructuras[3]. Además, también provocan la despolimerización de los carbohidratos[15].

Los radicales libres tienen varios efectos sobre los ácidos nucleicos, principalmente el radical $OH^{\bullet}$. Provocan la hidroxilación de las bases, el entrecruzamiento de las cadenas, ruptura y escisión de las cadenas de ADN, e inhibición de nucleótidos[15]. A su vez, el $NO^{\bullet}$ provoca la nitrosilación de bases del ADN[13].

El ADN mitocondrial es objeto de gran interés por varias razones: 1) las mitocondrias constituyen una de las principales fuentes de radicales libres derivados del O_2 y el ADN está expuesto a niveles elevados de dichos radicales, 2) posee pocos procesos de reparación de ADN, y 3) el ADN mitocondrial constituye un blanco preferente de muchos carcinógenos químicos xenobióticos.

Muchos metales pueden estar implicados en ciertas reacciones de formación de radicales libres, además de formar parte también, de ciertas metaloenzimas, entre las que se encuentran las enzimas antioxidantes que actúan como sistema de defensa contra radicales libres. Por tanto, la influencia de estos metales puede resultar de gran importancia, ya que pueden presentar un papel divalente, por un lado favorecer la formación de radicales libres, y por otro, formar parte del sistema de defensa. Los principales metales relacionados con el oxígeno y el sistema de defensa son el hierro (Fe), cobre (Cu) y selenio (Se), así como el manganeso (Mn), zinc (Zn), mercurio (Hg) y cadmio (Cd)[1,3,17].

2.- Sistema de defensa antioxidante

El sistema de defensa está constituido por una serie de sustancias que neutralizan los efectos tóxicos potenciales de los radicales libres. Son denominados como antioxidantes, secuestradores de

Observaciones finales

La incorporación de oxígeno molecular a diversas rutas metabólicas celulares supuso un salto evolutivo trascendental para el futuro desarrollo de la célula eucariota. Sin embargo, debido a esa actividad oxidativa, aparecieron en las células nuevas especies químicas caracterizadas por su alto poder reaccionante: los radicales de oxígeno.

Como consecuencia de ello, las células eucariotas han desarrollado complejos sistemas de defensa contra los radicales. El correcto funcionamiento de esos sistemas de defensa es vital para la célula, hasta el punto que su alteración por defecto genético conduce al establecimiento de graves cuadros patológicos, de los que las mutaciones en las enzimas SOD, CAT o en los transportadores electrónicos mitocondriales aportan claros ejemplos.

Mención aparte merece el reciente descubrimiento del radical óxido nítrico, que ha permitido explicar la generación del radical hidroxil en situaciones de defensa inmune inespecífica y en ciertos cuadros patológicos relacionados con la isquemia y la hipoxia.

Por último, no cabe duda que los sistemas antioxidantes celulares se deterioran con la edad, por lo que contribuyen decisivamente al proceso de envejecimiento normal y patológico.

Por todo ello, consideramos que es imprescindible el estudio de los radicales en el medio celular para el correcto conocimiento de la función celular.

BIBLIOGRAFIA

1.- MAESTRO R.F. del (1980). An approach to free radicals in medicine and biology. *Acta Physiol. Scand.* 492: 153-168.

2.- RADI R. (1993). Biological antioxidant defenses. *Toxicol. Health* 9: 53-62.

3.- YU B.P. (1994). Cellular defenses against damage from reactive oxygen species. *Physiol. Rev.* 74: 139-162.

4.- CHEESEMAN K.H., SLATER T.F. (1993). An introduction to free radicals biochemistry. *Brit. Med. Bull.* 49: 481-493.

5.- FRIDOVICH I. (1978). The biology of oxygen radicals. The superoxide radical is an agent of oxygen toxicity; superoxide dismutases provide an important defense. *Science* 201: 875-880.

6.- PRYOR W.A. (1986). Oxy-radicals and related species: their formation, lifetimes and reactions. *Ann. Rev. Physiol.* 48: 657-667.

3) Fe-SOD: es el tercer tipo de SOD, aunque no es bien conocido. Se encuentra tanto en células procariotas como en células eucariotas. En el hombre se ha demostrado su localización en plasma.

Se ha sugerido que la SOD ejerce parte de su protección antioxidante al inhibir la formación del $ONOO^-$, ya que los productos de la dismutación del O_2^- son menos reactivos y son metabolizados por sistemas enzimáticos específicos[2,21].

2.1.1.2.- Catalasa (CAT):

Elimina el H_2O_2 producido en la reacción de la SOD, catalizando la siguiente reacción:

$$H_2O_2 + H_2O_2 \xrightarrow{CAT} 2H_2O + O_2$$

Es una hemoproteína de peso molecular 240.000. Se localiza intracelularmente, principalmente en los peroxisomas, aunque se ha detectado su presencia también en microsomas y citosol. Contiene Fe (IV) en su centro de reacción[22], por lo que su actividad puede estar influenciada por el Fe[23].

Actúa sobre el H_2O_2, cuando éste se encuentra en elevadas concentraciones. Por su mecanismo de acción no presenta saturación cinética por el H_2O_2. También parece ser más efectiva sobre pequeñas moléculas.

2.1.1.3.- Glutatión peroxidasa (GP):

Esta enzima cataliza la misma reacción que la CAT, pero requiere la presencia de glutatión como substrato:

$$2GSH + H_2O_2 \xrightarrow{GP} GSSG + 2H_2O$$

$$GSSG + NADPH + H^+ \longrightarrow 2GSH + NADP^+$$

Durante esta reacción el glutatión reducido (GSH) se oxida (GSSG), pudiendo reducirse de nuevo, en presencia de NADPH, continuando así la reacción por aporte continuo de substrato.

Cataliza también reacciones de detoxificación, en las que intervienen los hidroperóxidos lipídicos (ROOH) generados en la peroxidación lipídica, dando lugar a alcoholes lipídicos (ROH) no tóxicos:

$$2GSH + ROOH \xrightarrow{GP} GSSG + ROH + H_2O$$

La GP es la peroxidasa más importante en las células de mamíferos. Tiene un peso molecular de 85.000 d. Se distinguen dos tipos de GP, una independiente de Se, y la otra dependiente de Se en

su molécula, que le confiere su actividad catalítica. Se localiza intracelularmente principalmente en el citosol, aunque también, se ha detectado actividad GP en la matriz mitocondrial.

Tiene el mismo substrato que la CAT, pero su afinidad es diferente. Parece ser más efectiva cuando hay bajas concentraciones de H_2O_2. Se ha sugerido que la GP es más importante que la CAT debido a su localización en el citosol que le proporciona una mayor capacidad de actuación y a que presenta una mayor afinidad por el H_2O_2. Además, en ciertos experimentos en los que la CAT permanecía inactiva, el exceso de H_2O_2 pudo ser combatido por la GP, sin embargo, al inactivar la GP, la CAT no presentó esa capacidad elevada de detoxificación[20].

Estas tres enzimas presentan también, un efecto de protección entre ellas, ya que el H_2O_2 inactiva el funcionamiento de la SOD, actuando la CAT y la GP. De forma similar, el radical O_2^- inhibe las actividades CAT y GP, favoreciendo la actuación de la SOD[20].

2.1.2.- Antioxidantes no enzimáticos:

Vitamina E: es el antioxidante más ampliamente distribuido en la naturaleza. Intracelularmente se encuentra asociado a membranas ricas en lípidos. El α-tocoferol es el más conocido. Por su propiedad lipofílica es el principal terminador de la cadena de radicales libres, por tanto, es altamente efectivo contra la peroxidación lipídica[2,3].

Ácido ascórbico: o vitamina C. Reacciona directamente con los radicales O_2^- y $OH^•$, y varios hidroperóxidos lipídicos. Su principal función es la de proteger contra la peroxidación lipídica. Otra de sus funciones es la de reciclar el radical de vitamina E, cuando ésta haya sido oxidada. La interacción entre ambas vitaminas tiene lugar en la interfase hidrofílica e hidrofóbica, ya que el α-tocoferol se encuentra en la bicapa lipídica y el ácido ascórbico en la fase acuosa.

A pH fisiológico la forma predominante es el anión ascorbato (AH^-) que por oxidación da lugar al ácido dehidroascórbico (DHA), a través de una forma intermedia que es el radical ascorbil (A^-).

$$AH^- \longleftrightarrow A^- \longleftrightarrow DHA$$

Posee una actividad dual actuando como antioxidante y como prooxidante. Como antioxidante, ejerce un efecto moderado cuando actúa por sí solo, mientras que al actuar con la vitamina E aumenta de forma sinergística la actividad antioxidante de la vitamina E:

$$ROO^• + Vit.\ E \longrightarrow ROOH + Vit.\ E^•$$

$$Vit.\ E^• + AH^- \longrightarrow Vit.\ E + A^•$$

Además presenta un efecto similar al de la catalasa metabolizando el H_2O_2, aunque no tan eficaz. Puede actuar como prooxidante, cuando se encuentra en elevadas concentraciones y en

presencia de metales de transición Fe^{3+} o Cu^{2+}, generando cofactores de radicales de oxígeno activados durante la promoción de la peroxidación lipídica.

Esta aparente dicotomía en la función del ácido ascórbico, parece estar regulada por su concentración y localización subcelular, ampliamente distribuida en fluidos intra y extracelulares[2,3].

Carotenoides: protegen de la peroxidación lipídica, reaccionando con los radicales libres, especialmente con el oxígeno singlete. El β-caroteno es el más importante. Funciona como anti y prooxidante. A bajas presiones parciales de O_2, presenta una gran actividad secuestradora de radicales, mientras que a elevadas presiones parciales de O_2, actúa como prooxidante con actividad autocatalítica[2,3].

Glutatión: tripéptido cuya estructura es: γ-glutamil-cisteína-glicina. Es el tiol de bajo peso molecular más abundante de todos los sistemas celulares de mamíferos. Se caracteriza por su grupo tiol reactivo y su enlace γ-glutamil que le confieren resistencia al ataque de peptidasas. Juega un papel importante en varios procesos de detoxificación. Interacciona con numerosos compuestos electrofílicos y oxidantes como H_2O_2, O_2^- $OH^\bullet$ y radicales de carbono. Está asociado a la glutatión peroxidasa actuando como substrato de esta enzima. Se ha sugerido la inhibición de la peroxidación lipídica de membranas mediante un factor dependiente del glutatión y la participación de cantidades catalíticas de vitamina:

$$R^\bullet + \text{Vit. E} \longrightarrow RH + \text{Vit. E}^\bullet \xrightarrow{GSH} \text{Vit. E} + GS^\bullet$$

$$2GS^\bullet \longrightarrow GSSH \xrightarrow{NADPH} 2GSH + NADP$$

La glutatión reductasa regenera el GSH consumido. Otro grupo de enzimas que utilizan al glutatión como cofactor son las glutatión S-transferasas, implicadas en la neutralización de radicales libres[3,24].

Ácido úrico: su acción antioxidante no está bien definida. Se sugiere que puede actuar preservando el ascorbato del plasma, probablemente al formar complejos con los metales de transición como Fe y Cu. Inhibe la xantina oxidasa circulante en la sangre y atenuando la producción de O_2^- y H_2O_2 intravascular. También parece estar relacionada con la activación de la síntesis de prostaglandinas iniciada por el araquidonato. Es importante en los humanos, ya que es un producto final del metabolismo de la urea, acumulándose extracelularmente donde jugará su papel antioxidante[2,3].

Ubiquinol-10: o coenzima Q-10. Se encuentra en diferentes biomembranas, principalmente en la membrana mitocondrial interna, donde funciona como transportador de electrones en la cadena respiratoria. Tras la oxidación de un e^- el ubiquinol-10 se convierte en ubisemiquinona, que se

reduce nuevamente mediante la cadena transportadora de electrones. Actúa como terminador de las reacciones oxidativas en cadena[2].

Proteínas plasmáticas: son principalmente la albúmina, transferrina y ceruloplasmina[3]. La **albúmina** posee la capacidad de captar el cobre evitando que dicho metal se encuentre libre en el plasma. La **transferrina** es una glicoproteína plasmática que actúa como el principal medio de transferencia del hierro. A pH ácido se favorece la liberación de Fe, que a su vez puede ser captado por otros compuestos quelantes como la ferritina que lo almacena como Fe^{3+}. Aunque no bien estudiado, se considera que la transferrina puede actuar como antioxidante, cuando está parcialmente saturada de Fe, previniendo la peroxidación lipídica ya que al capturar el Fe libre evita que la reacción de Fenton se lleve a cabo. Sin embargo, cuando se encuentra completamente saturada, puede actuar como prooxidante liberando Fe al plasma y, consecuentemente provocando el aumento de la reacción de Fenton, en condiciones de pH fisiológico y ausencia de compuesto quelador de Fe. La **ceruloplasmina** es otra glicoproteína plasmática que, en condiciones fisiológicas, puede unirse a 6 ó 7 iones de Cu por molécula. Juega un papel importante como antioxidante realizando su actividad en tres fases. Tiene la capacidad de unirse al Cu, que es un potente prooxidante, disminuyendo así la oxidación. Se ha sugerido que podría funcionar como ferroxidasa catalizando la oxidación de Fe^{2+} a Fe^{3+}, actividad requerida para la unión de este Fe^{3+} a la transferrina y apoferritina. Parece ser capaz de atrapar el radical O_2^{-}, aunque con una actividad más débil que la SOD, podría ser importante en el compartimiento extracelular.

Bilirrubina: aunque no bien conocido, parece actuar rompiendo las reacciones en cadena de la peroxidación lipídica[3].

2.2.- Sistemas de defensa secundarios

Enzimas lipolíticas: son las responsables de la reconstrucción de los constituyentes de membranas dañados o alterados. Su función podría ser la de mantener la integridad de las membranas y proporcionar un medio para regular la recuperación de lípidos de membrana, siendo las fosfolipasas las principales representantes[3].

Enzimas proteolíticas: pueden actuar degradando las proteínas alteradas por oxidación. Eliminan las moléculas dañadas o las reparan, evitando su acumulación. Se ha observado un incremento de la actividad proteolítica tras la exposición a radicales libres, lo que apoya la hipótesis de defensa de estas enzimas[3].

radicales libres, terminadores de cadenas de reacción o reductores. Son tan diversos como los propios radicales libres.

Generalmente, en condiciones normales, existe un equilibrio entre los radicales libres producidos y las defensas celulares, de forma que, el posible daño ocasionado por los radicales libres queda controlado. Sin embargo, cobran gran importancia en procesos de producción elevada de radicales, ya que son los responsables de hacer frente al consecuente efecto citotóxico.

Tradicionalmente, se ha designado al sistema de defensa como defensas primarias y secundarias. El sistema de defensa primario interacciona con los radicales libres generados directamente por la reducción del O_2. El sistema de defensa secundario actúa sobre radicales producidos por reacciones y procesos secundarios, e incluye los sistemas de reparación[2,3,18].

2.1.- Sistemas de defensa primarios

Son muchas las biomoléculas que pueden reaccionar con los radicales, principalmente con el $OH^{\bullet}$. Para ser un eficiente secuestrador de radicales *in vivo*, estas moléculas deben presentar las siguientes características: 1) reaccionar con una tasa controlada de difusión con el $OH^{\bullet}$, 2) existir en concentraciones más elevadas que las moléculas diana, 3) estar en el sitio(s) de generación de los radicales, y 4) después de reaccionar con los radicales, generar productos secundarios no tóxicos[2].

2.1.1.- Enzimas antioxidantes:

2.1.1.1.- Superóxido dismutasa (SOD):

Su principal función, descubierta por McCord y Fridovich en 1969[19], es catalizar la dismutación del radical O_2^-, que tiene lugar 10^4 veces más rápida que la dismutación espontánea.

$$O_2^- + O_2^- + 2H^+ \xrightarrow{SOD} H_2O_2 + O_2$$

Las células de mamíferos contienen 3 tipos de SOD[20]:

1) Cu,Zn-SOD: se encuentra en el citosol celular. Tiene un peso molecular de 32.500 d, y es un homodímero. Contiene Cu y Zn en su centro activo. El Cu parece ser esencial para su función catalítica, es reducido de Cu (II) a Cu (I), para ser posteriormente reoxidado. El Zn (II) no cambia de valencia y parece contribuir a la estabilidad estructural de la enzima.

2) Mn-SOD: se encuentra también en células eucariotas, localizada en la matriz de las mitocondrias. Es un homotetrámero de peso molecular aproximadamente 95.000. Presenta Mn (III) en su centro activo, el cual es reducido y oxidado en un ciclo redox. Es la encargada de eliminar la liberación de O_2^- durante la transferencia de e^- mitocondrial.

Este tipo de SOD se encuentra también en células procariotas, y se ha demostrado la existencia de secuencias homólogas de aminoácidos, entre la Mn-SOD bacteriana y mitocondrial[5].

7.- WAGNER J.R., MOTCHNIK P.A., STOCKER R., SIES H., AMES B.N. (1993). The oxidation of blood plasma and low density lipoprotein components by chemically generated singlet oxygen. *J. Biol. Chem.* 268: 18502-18506.

8.- KHAN A.U., KASHA M. (1994). Singlet molecular oxygen in the Haber-Weiss reaction. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91: 12365-12367.

9.- MAYER B., HEMMENS B. (1997). Biosynthesis and action of nitric oxide in mamalian cells. *TIBS* 22: 477-81.

10.- REGIDOR J., SUÁREZ ARAUJO C.P. (1996). Retrograde neural messenger in the brain. Preliminary study on the implications in the artificial neural networks. En: *Brain Processes, Theories, and Models. R. Moreno & J. Mira Mira (Eds.). The MIT Press. Cambridge, MASS.* pp. 360-369.

11.- BREDT D.S., SNYDER S.H. (1994). Nitric oxide: a physiologic messenger molecule. *Annu. Rev. Biochem.* 63: 175-195.

12.- MARLETTA M.A. (1989). Nitric oxide: biosynthesis and biological significance. *TIBS* 14: 488-92.

13.- GROSS S.S., WOLIN M.S. (1995). Nitric oxide: pathophysiological mechanisms. *Annu. Rev. Physiol.* 57: 737-769.

14.- STAMLER J.S., SINGEL D.J., LOSCALZO J. (1992). Biochemistry of nitric oxide and its redox-activated forms. *Science* 258: 1898-1902.

15.- FRANK L. (1991). Developmental aspects of experimental pulmonary oxygen toxicity. *Free Rad. Biol. Med.* 11: 463-494.

16.- WARD P.A., DUQUE R.E., SULAVIK M.C., JOHNSON K.J. (1983). *In vitro* and *in vivo* stimulation of rat neutrophils and alveolar macrophages by inmune complexes. Production of O_2 and H_2O. *Am. J. Pathol.* 110: 297-309.

17.- HIRAYAMA K., YASUTAKE A., INOVE M. (1993). Free radicals and trace elements. *Prog. Clin. Biol. Res.* 380: 257-268.

18.- FRANK L., MASSARO D. (1980). Oxygen toxicity. *Am. J. Med.* 69: 117-126.

19.- McCORD J.M., FRIDOVICH I. (1969). Superoxide dismutase: an enzymatic function for erythrocuprein (hemocuprein). *J. Biol. Chem.* 244: 6049-6055.

20.- SOSENKO I.R.S., FRANK L. (1991). Oxidants and antioxidants. En: *Basic mechanism of pediatric respiratory disease: celular and integrative. Chernik & Mellins (Eds.). B.C. Decker Inc. Philadelphia.* pp: 315-327.

21.- BECKMAN J.S., BECKMAN T.W., CHEN J., MARSHALL P.A., FREEMAN B.A. (1990). Apparent hydroxil radical production by peroxynitrite: implications for endothelial injury from nitric oxide and superoxide. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87: 1620-1624.

22.- FRIDOVICH I., FREEMAN B. (1986). Antioxidant defenses in the lung. *Ann. Rev. Physiol.* 48: 693-702.

23.-. TANSWELL A.K., FREEMAN B.A. (1984). Pulmonary antioxidant enzyme maturation in the fetal and neonatal rat. I. The influence of maternal iron supplements upon fetal lung catalase activity. *Pediatr. Res.* 18: 871-874.

24.- HALLIWELL B. (1992). Especies reactivas de oxígeno en los sistemas vivos: procedencia, bioquímica y papel patógeno en el hombre. En: *GSH system. Glutation. Eje de la defensa antioxidante. R.G. Crystal y J.R. Ramón (Eds.). Excerpta Médica.* pp: 33-47.